Synthesen von Phosphorsäure-Monoestern und Diphosphorsäure-Diestern in der Flavokoenzymreihe

---

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

WERNER FÖRY
aus Zug

Basel
Buchdruckerei Birkhäuser AG
1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544303_0099

Synthesen von Phosphorsäure-Monoestern und Diphosphorsäure-Diestern in der Flavokoenzymreihe

---

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

WERNER FÖRY
aus Zug

Basel
Buchdruckerei Birkhäuser AG
1967

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren PD Dr. P. HEMMERICH und Prof. Dr. S. FALLAB.

Basel, den 2. Mai 1967

Prof. Dr. H. HUBER
Dekan

Herrn WERNER FÖRY wurde von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 2. Mai 1967 erlaubt, diese verkürzte Fassung seiner am 2. Mai 1967 genehmigten Inauguraldissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel:

«Synthesen von Phosphorsäure-Monoestern und Diphosphorsäure-Diestern in der Flavokoenzymreihe»

kann eingesehen oder entliehen werden:

1. im Anorganisch-chemischen Institut der Universität Basel;
2. in der Universitätsbibliothek Basel;
3. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Separatabdruck aus Helvetica Chimica Acta, Volumen 50,
Fasciculus septimus, 1967

182. Synthese funktionell abgewandelter Flavocoenzyme: 3-Alkyl- und 2-Alkylimino-flavin-mononucleotide und -flavin-adenin-dinucleotide

Studien in der Flavinreihe, 14. Mitteilung[1])

In der 10. Mitteilung dieser Reihe [2] haben wir die Darstellung funktioneller Derivate des Riboflavins (Vitamin B_2) beschrieben. Die abgewandelten Funktionen waren die Carbonyle in den Stellungen 2 und 4 sowie die Imidgruppe in Stellung 3 des Flavinkerns. Mit der Synthese dieser Derivate verfolgten wir den Zweck, maximale Änderung der Löslichkeit bei minimalen Änderungen der Redox-Eigenschaften und der Raumerfüllung des Heteroaromaten zu erzielen. Es sollten damit niedermolekulare Coenzym-Modelle gefunden werden, die dem proteingebundenen Coenzym ähnlicher sind als das freie Coenzym, welches nur in wässeriger Lösung studiert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Überführung solcher Derivate in ihre 5'-Phosphate und 5'-Adenosindiphosphate. Die so erhaltenen funktionell abgewandelten Coenzyme sollen speziell zwei Aufgaben erfüllen:

Die Rekonstitution zerlegbarer Flavoproteine mit «falschen» Coenzymen soll untersucht werden. Erste Resultate in dieser Richtung erzielte HUENNEKENS [3] mit enzymatisch phosphorylierten Derivaten des Vitamins B_2. Die chemische Phosphorylierung wird notwendig, weil die enzymatische Flavinphosphorylierung durch Flavokinase sehr stark substratspezifisch ist [4] [5]. Obwohl die Enzymreaktion in der Seitenkette eintritt, werden doch keine in Stellung 2 oder 4 des Kerns abgewandelten Flavinderivate von Flavokinase umgesetzt.

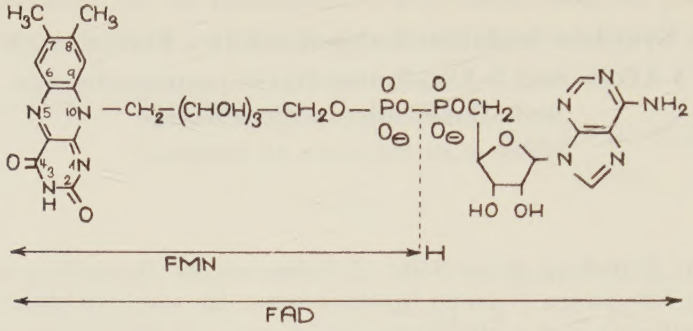
1) Die für die Rekonstitution bisher herangezogenen Flavoproteine sind D-Aminosäure-oxydase [5], NADPH: Cytochrom-c-oxydoreductase [6], NADPH-Dehydrogenase, Pyridoxamin-phosphatoxydase, Glykolatoxydase [7], NADPH-Diaphorase [8] und Oxynitrilase [9]. Wir hoffen jedoch, dass diese Untersuchungen auch auf Dihydroliponamid-dehydrogenase sowie «Old Yellow Enzyme» ausgedehnt werden können.

2) Die natürlichen Coenzyme Flavin-mononucleotid (FMN) und Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) (s. Formelschema 1a) bieten sich nicht an für Metallkoordinationsstudien, infolge der extremen Schwerlöslichkeit der Radikalchelate (Formel 1b): Wir wissen, dass die braunroten Niederschläge, welche bei Zusammengeben von halbreduziertem Flavocoenzym und diamagnetischem Schwermetall-Ion (Zn^{2+}, Cd^{2+}) entstehen, paramagnetisch sind, und dass die Signalintensität ihrer Elektronenspin-Resonanz ungefähr äquivalent ist dem Gehalt an Flavin [10]. Wir haben die Unlös-

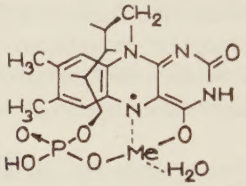
[1]) 13. Mitteilung: [1].

lichkeit dieser Radikalchelate daher auf die ternäre Koordination der Phosphat-Reste zurückgeführt [11].

Formelschema 1 a



1 b Metallchelat von halbreduziertem Flavocoenzym



Die einwandfreie Untersuchung dieses Phänomens erfordert jedoch Flavocoenzymderivate, deren Radikalchelate homogen gelöst bleiben unter geeigneten Bedingungen.

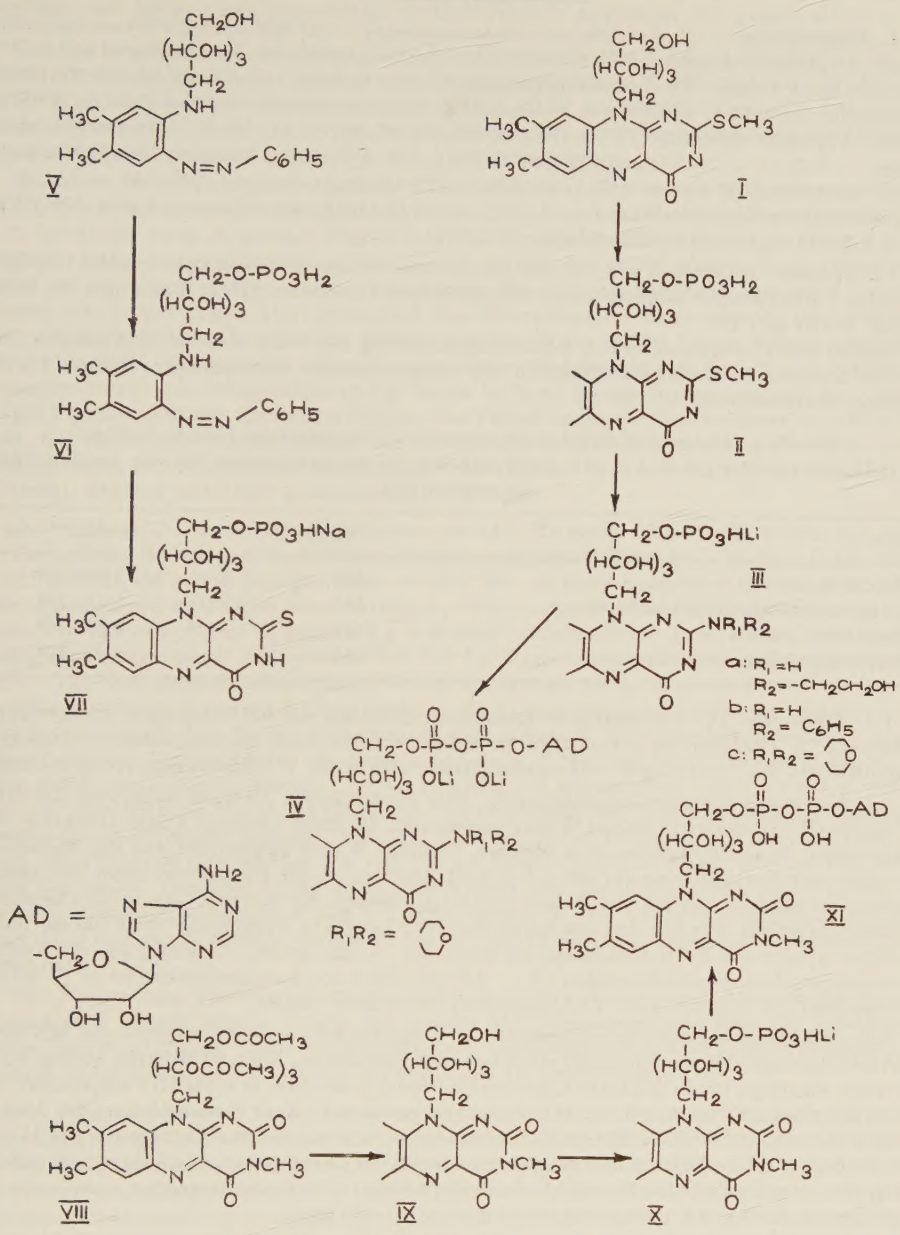
Zur Synthese dieser Flavocoenzym-Analogen können drei Wege beschritten werden (s. Reaktionsschema), je nachdem ob die Phosphorylierung der Abwandlung des heteroaromatischen Kerns vorausgeht, nachfolgt oder in einer Zwischenstufe der Synthese des phosphatfreien Flavins eingeschoben wird. Der erste Weg (V → VI → VII) erfordert das Mitschleppen der Phosphatgruppe über mehrere Stufen von Reaktionen am Kern und wurde daher nur im Falle des sehr empfindlichen 2-Thioflavinmononucleotids beschritten. Der dritte Weg (VIII → IX → X) ist scheinbar am einfachsten, liess sich jedoch nur im Falle 3-substituierter Flavin-Analogen mit guter Ausbeute verwirklichen.

Der zweite Weg (I → II → III) besteht in einem ersten Schritt in der Phosphorylierung von S-Methyl-2-thioriboflavin (I) mit einem Phosphoroxychlorid-Wasser-Gemisch als Lösungsmittel und Reagens und in einem zweiten Schritt – ohne Reinigung von II – in dem Ersatz der S-Methylgruppe durch primäre oder sekundäre Amine. Dieser Weg zeichnet sich einerseits durch die allgemeine Anwendbarkeit für die Synthese von 2-Iminoflavin-5′-phosporsäuren und anderseits durch die leichte Zugänglichkeit der Ausgangsverbindung I [2] aus.

Zur Synthese der Flavin-adenin-dinucleotid-Analogen kam das Verfahren von Khorana [12] [13] zur Anwendung, welches die Verknüpfung eines aktivierten Nucleosid-5′-phosphorsäureamides mit einer zweiten Nucleosid-Komponente impliziert.

Die rohen FMN- bzw. FAD-Analogen wurden durch Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt, wobei die DEAE-Cellulose-Schicht durch Gradientenelution

Reaktionsschema



in neutralem Milieu im Falle der FMN-Analogen (vgl. Figur) und in saurem Milieu (pH 2,7–5,5) im Falle der FAD-Analogen entwickelt wurde. Eine Ausnahme bildete das 2-Thioriboflavin-5′-phosphat, das sich auf der DEAE-Cellulose auf Grund grosser Oxydationsempfindlichkeit innerhalb kurzer Zeit zersetzte. In diesem Falle konnte als stabiles Endprodukt Riboflavin-5′-phosphat eluiert und identifiziert werden.

Experimenteller Teil

1. Allgemeines. – 1.1. *Zur Dünnschichtchromatographie* (auf MN-KieselgelS[2]) als stationärer Phase). Als chromatographisch rein wurden Substanzen angesehen, die im Sichtbaren und im UV. nur *einen* Fleck zeigten. Als chromatographisch identisch wurden Substanzen gleicher Farbe und Fluoreszenz betrachtet, wenn sie in mindestens 3 Fliessmittelgemischen den gleichen Rf-Wert zeigten. Fliessmittelgemische: A: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 6:2:2; B: *n*-Butanol/Äthanol/Wasser = 6:2:2; C: *n*-Butanol/Äthanol/2N NH_3 = 6:2:2; D: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 2:1:1; E: Acetonitril/Wasser = 7:3; F: Äthanol/1N Ammoniumacetat (pH 7,5) = 5:2, G: *t*-Amylalkohol/Ameisensäure/Wasser = 3:2:1; H: *n*-Butanol/Aceton/Eisessig/5-proz. NH_3/Wasser = 7:5:3:3:2; I: Diäthyläther/Methanol = 9:1.

1.2. *Spektren.* Im Bereich von 700–200 nm mit einem CARY-14-Spektrophotometer in folgenden 0,1M Pufferlösungen aufgenommen: Phosphat (pH 7), Acetat (pH 5), Borat (pH 9), Sulfat (pH 2), NaOH (pH 13).

Bei der spektrophotometrischen Reinheitsbestimmung der FMN- bzw. FAD-Analogen wurden die molaren Extinktionskoeffizienten der entsprechenden nicht-phosphorylierten Flavin-Analogen zugrundegelegt (s. Tab. 1).

Tabelle 1. *Molare Extinktionskoeffizienten von 2-substituierten Flavin-Analogen* (0,1M Phosphatpuffer pH 7, $t = 25°$; die Synthesen der entsprechenden Flavine wurden früher beschrieben [2])

Flavin	λ (nm)	ε ($Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
2-Thioriboflavin	494	$2{,}08 \cdot 10^4$
2-(β-Hydroxyäthylimino)-riboflavin	451	$1{,}73 \cdot 10^4$
2-Phenyliminoriboflavin	472	$1{,}89 \cdot 10^4$
2-Morpholino-2-desoxyriboflavin	464	$1{,}93 \cdot 10^4$

1.3. *Titrationen.* Die acidimetrische Reinheitsbestimmung der FMN-Analogen erfolgte durch acidimetrische Titration des sekundären Phosphats mittels eines thermostatierten METROHM-Combititrators mit kombinierter Mikroglaselektrode «U» unter V^{2+}-desoxygeniertem Stickstoff.

1.4. *Kationenaustauscher-Chromatographie.* 10 g des trockenen Austauscherpulvers MN-2100-P-Cellulose(H^+)[2]) wurden in 500 ml Wasser suspendiert, die trübe wässerige Phase dekantiert, der verbleibende, dicke Brei nochmals im gleichen Volumen Wasser suspendiert und die Suspension mit wässeriger Pyridinlösung auf pH 5,5 gestellt. Der nun in der Pyridinium-Form vorliegende Austauscher wurde abfiltriert, mit Wasser neutral gewaschen und in einem Guss in die Chromatographiesäule gefüllt. Für den Austausch von Na^+ oder Li^+ gegen $Pyridinium^+$ im Falle der FMN-Analogen wurden die FMN-Alkalisalze, im Minimum Wasser gelöst, vorsichtig auf die Austauschersäule gegeben (Säulendimension: ∅ = 3,5 cm, Höhe der Austauscherschicht = 25–30 cm) und während 2–3 Stunden unter Lichtausschluss mit Wasser eluiert.

1.5. *Anionenaustauscher-Chromatographie.* 10 g des trockenen Austauscherpulvers MN-2100-DEAE-Cellulose(Cl^-)[2]) wurden in 600 ml Wasser aufgeschlämmt. Nach 30 Minuten Stehen wurde die trübe wässerige Phase dekantiert, der verbleibende, dicke Brei in 0,5M HCl suspendiert und der Austauscher abfiltriert und mit Wasser neutral gewaschen. Nach Suspendierung des Austauschers in 0,5M NaOH wurde mit 0,5M HCl neutralisiert, filtriert und der Austauscher mit Wasser chloridfrei gewaschen. Dann wurde er in einem Guss in die Chromatographiesäule gefüllt und mit den in Wasser gelösten FMN- bzw. FAD-Analogen beladen. Elutionsbedingungen s. unten bei der Synthesenbeschreibung der einzelnen FMN- bzw. FAD-Analogen.

II. Synthesen. – 2.1. *Monophosphat von 1-(D-1-Ribitylamino)-3,4-dimethyl-6-phenylazobenzol (VI):* 7,1 g Azofarbstoff V wurden nach FLEXER & FARKAS [14] mit einem Phosphoroxychlorid-Wasser-Gemisch phosphoryliert, der kristalline freie Phosphorsäureester VI in 200 ml Wasser aufgeschlämmt und diese Suspension mit 1N NaOH auf pH 8,5 gestellt. Die schwach getrübte Lösung wurde mit Aktivkohle in eine Vorlage von $BaCl_2$ aq. filtriert, der feinverteilte, kar-

[2]) Produkt der Firma MACHEREY, NAGEL & Co., 516 Düren (Deutschland).

minrote Niederschlag zentrifugiert, mit Wasser chloridfrei gewaschen und nach mehrmaligem Digerieren mit Äthanol und Diäthyläther im Hochvakuum getrocknet: 9,2 g (80% d.Th.).

2.2. *2-Thioriboflavin-5'-phosphat (VII):* Eine Suspension von 7,7 g VI (Ba-Salz) in 200 ml Wasser wurde 15 Min. mit 10 g stark saurem Ionenaustauscher (H^+) (MERCK I) gerührt, filtriert, bei 50° im Vakuum auf 30–40 ml eingeengt und mit LiOH aq. auf pH 4,5 gestellt. Die Lösung wurde mit wenig Aktivkohle in 250 ml Aceton filtriert. Der amorphe Niederschlag des Mono-Li-Salzes wurde abfiltriert und mit Aceton und Äther gewaschen.

In einem 500-ml-Sulfierkolben mit Kühler, $CaCl_2$-Rohr, Rührer und N_2-Zuführung wurden 3,8 g 2-Thiobarbitursäure (27 mMol) (FLUKA, Buchs SG), suspendiert in 110 ml Eisessig/*n*-Butanol (4:7), bei 53–55° unter N_2 gerührt. Das Li-Salz von VI, gelöst in 250 ml Eisessig/*n*-Butanol (1:4), wurde zur ersten Suspension gegeben und unter N_2 36 Std. bei 53–55° gerührt. Nach Stehen über Nacht bei Raumtemperatur wurde der dunkelrote Niederschlag abfiltriert und mit *n*-Butanol/Eisessig (99:1), Aceton und Äther gewaschen. Der Filterrückstand wurde unter N_2 bei 50° in 100–150 ml Dimethylsulfoxid suspendiert, filtriert und das Filtrat in 500–700 ml Aceton eingerührt. Das 2-Thio-FMN (VII) erschien sofort als voluminöser Niederschlag, der filtriert und mit Aceton gewaschen wurde. Das Rohprodukt (4,4 g) wurde in 50 ml Wasser suspendiert, mit 0,1 N NaOH auf pH 7 gestellt und mit Aktivkohle filtriert. Das Filtrat wurde mit 2 M Essigsäure auf pH 4,5 gestellt, mit Aktivkohle in eine Vorlage von 250–300 ml Äthanol filtriert und eine Stunde bei 0° stehengelassen. Der feinverteilte Niederschlag wurde filtriert und nacheinander mit Äthanol aq. (80-proz.), Äthanol und Äther gewaschen: 2,7 g (31%).

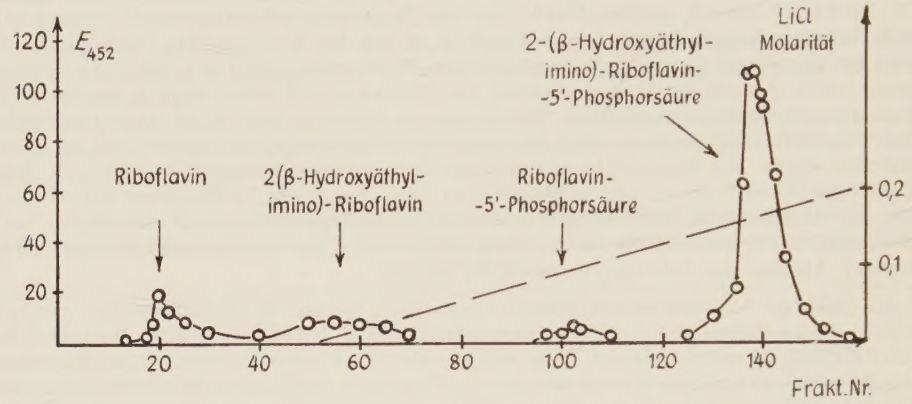
2.3. *S-Methyl-2-thioriboflavin-5'-phosphorsäure (II):* In einem 50-ml-Sulfierkolben mit Kühler, $CaCl_2$-Rohr, Rührer und N_2-Zuführung wurden während 2–3 Std. bei 0° 6,9 g H_2O (37 mMol) zu 28,9 g $POCl_3$ (18 mMol) getropft. Dann wurde 2 Std. bei Raumtemperatur gerührt, über Nacht stehengelassen und schliesslich unter starkem N_2-Strom aufgerührt, bis die HCl-Entwicklung (Aufschäumen) aufhörte. Unter N_2 wurden 2 g S-Methyl-2-thioriboflavin (I) [2] in das Phosphorylierungsgemisch eingetragen und während 8–9 Std. bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. – In einem zweiten Sulfierkolben (500 ml) mit Kühler, $CaCl_2$-Rohr und Rührer wurden 400 bis 500 ml trockener Äther auf 5–10° gekühlt und die Lösung des phosphorylierten I innerhalb 2–3 Minuten zugetropft. Das Phosphorylierungsprodukt (II nebst Polyphosphorsäureestern) schlug sich in hellgelben Flocken nieder. Die Suspension wurde 15 Min. bei Raumtemperatur kräftig gerührt, durch eine Glasfritte filtriert, der Niederschlag mit wasserfreiem Äther gewaschen und im Vakuum unter leichtem Erwärmen getrocknet. Die hygroskopische Mischung von Mono- und Polyphosphorsäureester wurde während 15–20 Min. in 30 ml Dioxan/Wasser (6:1) hydrolysiert und mit wenig Aktivkohle in eine Vorlage von 700–800 ml Äther filtriert. II schlug sich als braunrotes öliges Gel nieder. Letzteres wurde durch Dekantieren und Verdampfen vom Äther befreit, im Minimum Methanol gelöst und wieder mit Äther ausgefällt. Das Auflösen in Methanol und Ausfällen mit Äther wurde solange wiederholt, bis sich das Öl zu einem amorphen Niederschlag verfestigt hatte.

Der Niederschlag wurde in Methanol gelöst und durch mehrmaliges Abdampfen mit Benzol/Äthanol vom Wasser befreit. Wegen der grossen Hydrolysenempfindlichkeit der 2-S-Methylflavine war die Reinigung durch Anionenaustauscher-Chromatographie für II nicht geeignet. Das Produkt wurde sofort zu den 2-Imino-5'-Phosphaten III weiterverarbeitet.

2.4. *2-Iminoriboflavin-5'-phosphorsäuren (IIIa, b, c):* Der unter 2.3 beschriebene Phosphorsäureester II, gelöst in 20–30 ml abs. Methanol, wurde in einem 100-ml-Sulfierkolben mit Rührer, Kühler, $CaCl_2$-Rohr und N_2-Zuführung mit 30 ml Amin (Äthanolamin, Morpholin, Anilin) während 1–2 Std. zur Reaktion gebracht. Das 2-Imino-FMN-Analoge kristallisierte unter Zusatz von 250 ml Aceton innerhalb einer Stunde bei 0°. Der Niederschlag wurde filtriert, mit Aceton gewaschen, in 50–60 ml Wasser suspendiert, mit 1 N NaOH auf pH 8 gestellt und mit Aktivkohle filtriert. Das Filtrat wurde sorgfältig auf eine MN-2100-DEAE-Cellulose-Chromatographiesäule (Cl^-) gegeben (Säulendimension: $\varnothing$ = 2,5 cm, Schichthöhe = 80–90 cm) und die Säule mit Wasser gewaschen, bis die Extinktion des Eluates beim Absorptionsmaximum im Sichtbaren einen Wert $E_{\lambda max}$ = 0,1 erreicht hatte.

Die Flavin-5'-phosphorsäuren wurden mittels LiCl-Lösung linear ansteigender Konzentration in Fraktionen von 18–20 ml eluiert.

Das Mischgefäss enthielt 2000 ml H_2O und das Reservoir 2000 ml 0,8 M LiCl. Der Flavin-Gehalt an Fraktionen wurde durch Extinktionsmessungen beim Absorptionsmaximum im Sichtbaren bestimmt. Während der ganzen Trennoperation wurde eine Tropfgeschwindigkeit von 1,6–2 ml/Min. eingehalten. Die Mononucleotid-Fraktionen (vgl. Figur) wurden bei 40° Badtemperatur im Vakuum bis zur beginnenden Kristallisation eingeengt, die Suspension mit 0,1 M $HClO_4$ unter gleichzeitiger Auflösung auf pH 5 gestellt und mit wenig Aktivkohle in eine Vorlage von 200–250 ml Aceton filtriert. Die zeitweise auftretende Phasentrennung wurde durch tropfweise Zugabe von Methanol aufgehoben, was eine sofortige Kristallisation bewirkte. Die Kristallisationslösung wurde 1 Std. bei 0° aufbewahrt, filtriert und der Filterrückstand mit Aceton und Äther gewaschen.



Reinigung von rohen Flavin-mononucleotid-Analogen durch Anionenaustauscher-Chromatographie in neutralem Milieu

2.5. *3-Methylriboflavin (IX):* Eine Suspension von 5,6 g 3-Methyl-tetra-O-acetyl-riboflavin (VIII) [11] (10 mMol) in 100 ml 6 M HCl wurde 2 Std. bei 90–95° gehalten, wobei allmähliche Auflösung eintrat. Man engte die Lösung im Vakuum bis zur beginnenden Kristallisation ein, fügte 200 ml Wasser zu und liess 2 Std. bei 0° stehen. Der gelborange Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser neutral gewaschen und getrocknet. Das Rohprodukt wurde in wenig warmer 6 M HCl aufgenommen, mit Tierkohle filtriert, mit gleichem Volumen Wasser verdünnt und angerieben. Innerhalb 6 Std. kristallisierten bei 0° 3,6 g (92,5%) chromatographisch reines IX in gelben Nadelbüscheln vom Smp. 265–270° (Zers.)

2.6. *3-Methylriboflavin-5'-phosphorsäure (X):* 3 g IX wurden mit einem Gemisch von 14,4 g Wasser und 61,3 g $POCl_3$ analog 2.3. phosphoryliert (Dauer der Phosphorylierung 36 Std.). Nach der üblichen Aufarbeitung wurde die hygroskopische Mischung von Mono- und Polyphosphorsäureestern über Nacht in 68 ml Dioxan/Wasser (10,3:1) hydrolysiert, das Dioxan bei 30° im Vakuum verdampft und die Flavinphosphorsäure mit Äther ausgefällt. Der ölige Rückstand wurde unter analogen Bedingungen (s. 2.3.) in eine semikristalline Modifikation übergeführt und anschliessend durch Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt.

2.7. *Flavin-Adenin-Dinucleotide (IV, XI):* 0,2 mMol Flavin-5'-phosphat (Li- oder Na-Salz), gelöst in 10 ml Wasser, wurde mit verdünnter NH_3 auf pH 7 gestellt und mittels Kationenaustauscher-Chromatographie in das Pyridiniumsalz übergeführt. Das wässerige Eluat wurde mit Pyridin auf pH 7 gestellt, im Bad von 40° im Vakuum auf 5 ml eingeengt, mit 0,15 ml tri-*n*-Butylamin in 10 ml Pyridin abs. versetzt und abgedampft. Um die letzten Wasserspuren zu entfernen, wurde das Pyridiniumsalz viermal mit je 40–50 ml Pyridin abs. bei 40° im Vakuum eingedampft.

0,052 g Adenosin-5'-phosphorsäuremorpholid [13] wurde in gleicher Weise viermal mit Pyridin abs. eingedampft, der Rückstand in 20 ml Pyridin abs. gelöst und mit dem Pyridiniumsalz des FMN, das in 10–20 ml Pyridin abs. und 1–5 ml Dimethylformamid gelöst wurde, vereinigt. Das Phosphatgemisch wurde im Vakuum bei 40° auf ein Volumen von 10–15 ml eingeengt und verschlossen unter Lichtausschluss bei 40° über P_2O_5 aufbewahrt. Die Pyridinlösung wurde bei 40° im Vakuum soweit als möglich eingedampft und der Rückstand in wenig Wasser gelöst. Die wässerige

Tabelle 2. *Analytische und physikalische Daten der hergestellten Flavin-mononucleotide (FMN)*

Flavin-mononucleotid	2-Thio-FMN (VII)	2-Phenylimino-FMN (III b)	2-(β-Hydroxyäthylimino)-FMN (III a)	2-Morpholino-2-desoxy-FMN (III c)	3-Methyl-FMN (X)
Bruttoformel	$C_{17}H_{22}O_8N_4SPNa$, NaH_2PO_4, 3 H_2O (668,4)	$C_{23}H_{31}O_{11}N_5P$, $HClO_4$, 2 H_2O (603,9)	$C_{19}H_{26}O_{13}N_5P$, $LiClO_4$, 2 H_2O (641,9)	$C_{21}H_{26}O_9N_5PLi_2$, 4 H_2O (610,4)	$C_{18}H_{22}O_9N_4PLi$, 3 H_2O (530,3)
Gehaltsbestimmung elementaranalytische	Ber. N 8,4 S 4,8 P 9,0%	Ber. C 45,7 N 11,6 P 5,1 H 5,1%	Ber. C 37,7 H 4,1 N 11,6%		Ber. C 40,8 H 5,3 N 10,6 P 5,8%
	Gef. N 8,7 S 4,6 P 9,3%	Gef. C 45,7 N 11,5 P 5,3 H 4,9%	Gef. C 37,7 H 4,1 N 11,6%		Gef. C 40,5 H 5,1 N 10,4 P 5,7%
acidimetr.	98%	99%	98%	96%	98%
spektrophotometr.	97,5%	96%	97%	97%	97%
Spektren					
λ_{max} (6 M HCl)	435, 286 nm				
λ_{max} (2 M HCl)		457, 395, 290 nm	442, 385, 275 nm	455, 390, 286 nm	
λ_{max} (pH 7)	487, 398, 316 nm	473, 373, 280 nm	451, 363, 272 nm	461, 372, 280 nm	
λ_{max} (pH 13)	492, 375, 290 nm				
Ausbeuten	31% [a]	20% [b]	20% [b]	28% [b]	40% [c]

[a] bezogen auf Ribityl-azofarbstoff V

[b] bezogen auf S-Methyl-2-thioriboflavin (I)

[c] bezogen auf 3-Methyl-tetra-O-acetyl-riboflavin (VIII)

Tabelle 3. *Analytische und physikalische Daten der hergestellten Flavin-adenin-dinucleotide (FAD)*

Flavin-adenin-dinucleotid	3-Methylflavin-adenin-dinucleotid (XI)	2-Morpholino-2-desoxyflavin-adenin-dinucleotid (IV)
Bruttoformel	$C_{28}H_{33}O_{15}N_9P_2Li_2$ (811.5)	$C_{32}H_{38}O_{15}N_{10}P_2Li_2$ (878,4)
Gehaltsbestimmung		
spektrophotometrisch	99%	96%
dünnschichtchromatographisch [a] [e]	96%	92%
Rf(FMN)/Rf(FAD) [a]	3,08	3,22
$E_{260\,nm}/F_\lambda$ (sichtbar) [b] [d] (FMN)	2,3 (λ = 450 nm)	0,736 (λ = 464 nm)
$E_{260\,nm}/E_\lambda$ (sichtbar) [b] [d] (FAD)	3,3 (λ = 450 nm)	1,23 (λ = 464 nm)
Gradientenelution		
Mischgefässvolumen	2000 ml, 10^{-3} M an HCl	2000 ml, 10^{-2} M an Li-acetat (pH 5,5)
Reservoirvolumen	2000 ml, 10^{-3} M an HCl, 0,25 M an LiCl	2000 ml, 10^{-2} M an Li-acetat (pH 5,5) 0,25 M an LiCl
Tropfgeschwindigkeit in ml/Min.	2,5	2
Ausbeuten [c]	17%	20%

[a] System D (vgl. 1.1.)

[b] 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7)

[c] bezogen auf Adenosin-5′-phosphorsäuremorpholid

[d] vgl. [15]; $E_{260\,nm}/E_{450\,nm}$ (FMN) = 2,26; $E_{260\,nm}/E_{450\,nm}$ (FAD) = 3,26

[e] Die Flecke der dünnschichtchromatographisch entwickelten FMN- bzw. FAD-Analogen wurden abgekratzt, Kieselgel mit 0,1 M Phosphatpuffer extrahiert und Gehalt an FMN bzw. FAD spektrophotometrisch bestimmt.

Lösung wurde zweimal mit Äther extrahiert, die Ätherschicht zweimal mit je 5 ml Wasser durchgewaschen und die wässerigen Lösungen vereinigt. Die Lösung wurde mit verdünnter NH_3 auf pH 7 gestellt und vorsichtig auf eine DEAE-Cellulose-Kolonne (2,5 × 45 cm, Chloridform) gegeben. Die DEAE-Cellulose wurde mit Wasser bis zu einem Extinktionswert $E = 0{,}1$ eluiert, gefolgt von einer Gradientenelution (s. Tab. 3). Die FAD-Fraktionen wurden mit LiOH aq. auf pH 6 gestellt und bei einer Badtemperatur unter 30° im Vakuum auf 3–5ml eingeengt. Die Lösung wurde auf pH 6 gestellt und in eine Vorlage von 100 ml Aceton filtriert. Das Dilithium-Salz des FAD-Analogen erschien als voluminöser Niederschlag, der filtriert, mit Aceton und Äther gewaschen und 30 Std. bei Zimmertemperatur im Hochvakuum getrocknet wurde.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie dem U.S. Public Health Service (Grant Nr. GM 14241–1) für Apparate-Beihilfe.

Die Mikroanalysen verdanken wir der Firma Hoffmann-La Roche, Basel (Dr. Dirscherl).

SUMMARY

Functional derivatives of flavo-coenzymes, altered in position 2 or 3, have been synthesized in order to check the coenzyme specificity of flavo-apoproteins. Phosphorylation and phosphate separation methods have been adapted to the synthesis of 2-imino-, 2-thio- and 3-alkyl-flavin mono- and di-nucleotides.

LITERATURVERZEICHNIS

[1] K.H. Dudley & P. Hemmerich, J. org. Chem. (1967) im Druck.
[2] F. Müller & P. Hemmerich, Helv. *49*, 2352 (1966).
[3] F.M. Huennekens, S.P. Felton & E.E. Snell, J. Amer. chem. Soc. *79*, 2258 (1957).
[4] D.B. McCormick & R.C. Butler, Biochim. biophysica Acta *65*, 326 (1962); D.B. McCormick, Ch. Arsenis & P. Hemmerich, J. biol. Chemistry *238*, 3095 (1963).
[5] D.B. McCormick, B.M. Chassy & J.C.M. Tsibris, Biochim. biophysica Acta *89*, 447 (1964); B.M. Chassy & D.B. McCormick, *ibid. 110*, 91 (1965).
[6] Ch. Arsenis & D.B. McCormick, Biochim. biophysica Acta *92*, 440 (1964).
[7] J.C.M. Tsibris, D.B. McCormick & L.D. Wright, J. biol. Chemistry *241*, 1138 (1966).
[8] J.A. Roth, B.M. Chassy & D.B. McCormick, Biochim. biophysica Acta *118*, 429 (1966).
[9] E. Pfeil, persönliche Mitteilung.
[10] P. Hemmerich, F. Müller & A. Ehrenberg in «Oxidases and related Redox Systems», Ed. by T.E. King, H.S. Mason & M. Morrison, John Wiley & Sons, Inc., New York City 1965, Vol. I, p. 157.
[11] P. Hemmerich, Helv. *47*, 464 (1964).
[12] J.G. Moffatt & H.G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. *83*, 649 (1961).
[13] S. Roseman, J.J. Distler, J.G. Moffatt & H.G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. *83*, 659 (1961).
[14] L.A. Flexser, U. Montclair & W.G. Farkas, U.S. Patent 21610176 (1952).
[15] L.G. Whitby, Biochem. J. *54*, 437 (1953).

Curriculum vitae

Am 20. Januar 1939 wurde ich, WERNER FÖRY in Arth am See (SZ) geboren, als Sohn des Ludwig Föry und seiner Frau Theresia geb. Weber. In den Jahren 1946–51 besuchte ich die Primarschule in Arth. Anschliessend trat ich in das Benediktiner-Kollegium in Disentis ein. Aus gesundheitlichen Gründen war ich gezwungen, meine Gymnasialausbildung in Disentis abzubrechen. Im Herbst 1952 trat ich ins Kollegium Maria-Hilf in Schwyz ein, wo ich meine Schulausbildung im Sommer 1958 mit der Maturitätsprüfung (Typus A) abschloss.

Im Oktober des gleichen Jahres immatrikulierte ich mich an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, mit Chemie als Hauptfach. Im Verlaufe meines Studiums legte ich folgende Examina ab:

Vorexamen in Anorganischer und Analytischer Chemie (SS 1960)
Erstes Vordiplom in Mathematik und Mineralogie (SS 1960)
Zweites Vordiplom in Physik und Zoologie (WS 1962)
Examen in Farbenchemie (SS 1963)
Diplom in Anorganischer Chemie, Organischer Chemie und Physikalischer Chemie (WS 1963).

Während des Jahres 1964 war ich in der Forschungsabteilung der Firma Hoffmann-LaRoche tätig. Im Januar 1965 begann ich meine Dissertation unter der Leitung von Herrn PD Dr. P. Hemmerich. Ihm bin ich für sein Wohlwollen und Interesse am Entstehen der vorliegenden Arbeit zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. H. Erlenmeyer für viele wertvolle Ratschläge und für sein Interesse an der vorliegenden Arbeit.

In den Jahren 1965–67 war ich Unterrichtsassistent im qualitativ-analytischen Praktikum unter der Leitung der Herren Professoren H. Erlenmeyer und S. Fallab.

Im Verlaufe meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika der folgenden Herren Professoren und Dozenten: H. Erlenmeyer, P. Huber, S. Fallab, H. Dahn, P. Bearth, E. Wenk, C. Grob, W. Kuhn, M. Brenner, T. Reichstein, R. Witzinger, Ch. Tamm, H. Labhart, P. Hemmerich, H. Brintzinger, P. Buchner, H. Nüesch, A. Portmann, J. Gantner, K. Jaspers.

Allen diesen Herren danke ich für ihre Bemühungen.